

特 許 協 力 条 約

P C T

特許性に関する国際予備報告（特許協力条約第二章）

（法第 12 条、法施行規則第 56 条）

〔P C T 36 条及び P C T 規則 70〕

出願人又は代理人 の書類記号 SAP-717-PCT	今後の手続きについては、様式 P C T / I P E A / 4 1 6 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 2 0 0 4 / 0 1 7 9 5 9	国際出願日 (日. 月. 年) 0 2 . 1 2 . 2 0 0 4	優先日 (日. 月. 年) 0 2 . 1 2 . 2 0 0 3
国際特許分類 (I P C) Int.Cl. <i>C07K16/44(2006. 01)</i> , <i>C12N5/10(2006. 01)</i> , <i>C12N15/02(2006. 01)</i> , <i>C12P21/08(2006. 01)</i> , <i>G01N33/53(2006. 01)</i>		
出願人 (氏名又は名称) 株式会社先端生命科学研究所		

1. この報告書は、P C T 35 条に基づきこの国際予備審査機関で作成された国際予備審査報告である。 法施行規則第 57 条 (P C T 36 条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。
3. この報告には次の附属物件も添付されている。 a. <input checked="" type="checkbox"/> 附属書類は全部で 2 ページである。 <input checked="" type="checkbox"/> 補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関が認めた訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面の用紙 (P C T 規則 70. 16 及び実施細則第 607 号参照) <input checked="" type="checkbox"/> 第 I 欄 4. 及び補充欄に示したように、出願時における国際出願の開示の範囲を超えた補正を含むものとこの国際予備審査機関が認定した差替え用紙 b. <input type="checkbox"/> 電子媒体は全部で (電子媒体の種類、数を示す)。 配列表に関する補充欄に示すように、電子形式による配列表又は配列表に関連するテーブルを含む。 (実施細則第 802 号参照)
4. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 <input checked="" type="checkbox"/> 第 I 欄 国際予備審査報告の基礎 <input type="checkbox"/> 第 II 欄 優先権 <input type="checkbox"/> 第 III 欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 <input checked="" type="checkbox"/> 第 IV 欄 発明の単一性の欠如 <input checked="" type="checkbox"/> 第 V 欄 P C T 35 条 (2) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 <input type="checkbox"/> 第 VI 欄 ある種の引用文献 <input type="checkbox"/> 第 VII 欄 国際出願の不備 <input type="checkbox"/> 第 VIII 欄 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 2 9 . 0 9 . 2 0 0 5	国際予備審査報告を作成した日 0 3 . 0 4 . 2 0 0 6		
名称及びあて先 日本国特許庁 (I P E A / J P) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号	特許庁審査官 (権限のある職員) 佐藤 巖	4 B	3 3 3 4
	電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8		

様式 P C T / I P E A / 4 0 9 (表紙) (2 0 0 5 年 4 月)

第 I 欄 報告の基礎

1. 言語に関し、この予備審査報告は以下のものを基礎とした。

- ☒ 出願時の言語による国際出願
☐ 出願時の言語から次の目的のための言語である _____ 語に翻訳された、この国際出願の翻訳文
☐ 国際調査 (PCT規則12.3(a)及び23.1(b))
☐ 国際公開 (PCT規則12.4(a))
☐ 国際予備審査 (PCT規則55.2(a)又は55.3(a))

2. この報告は下記の出願書類を基礎とした。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この報告において「出願時」とし、この報告に添付していない。)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書

第 _____ 1-18 _____ ページ、出願時に提出されたもの
 第 _____ ページ*、 _____ 付かで国際予備審査機関が受理したもの
 第 _____ ページ*、 _____ 付かで国際予備審査機関が受理したもの

☒ 請求の範囲

第 _____ 1,8-11 _____ 項、出願時に提出されたもの
 第 _____ 項*、PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 第 _____ 5-7 _____ 項*、 24.02.2006 付かで国際予備審査機関が受理したもの
 第 _____ 項*、 _____ 付かで国際予備審査機関が受理したもの

☒ 図面

第 _____ 1-15 _____ ページ/図、出願時に提出されたもの
 第 _____ ページ/図*、 _____ 付かで国際予備審査機関が受理したもの
 第 _____ ページ/図*、 _____ 付かで国際予備審査機関が受理したもの

☐ 配列表又は関連するテーブル

配列表に関する補充欄を参照すること。

3. ☒ 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☒ 請求の範囲 第 _____ 2-4 _____ 項
☐ 図面 第 _____ ページ/図
☐ 配列表(具体的に記載すること) _____
☐ 配列表に関連するテーブル(具体的に記載すること) _____

4. ☒ この報告は、補充欄に示したように、この報告に添付されかつ以下に示した補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

☐ 明細書 第 _____ ページ
☒ 請求の範囲 第 _____ 1,9,10 _____ 項
☐ 図面 第 _____ ページ/図
☐ 配列表(具体的に記載すること) _____
☐ 配列表に関連するテーブル(具体的に記載すること) _____

* 4. に該当する場合、その用紙に“superseded”と記入されることがある。

第IV欄 発明の単一性の欠如

1. ☐ 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付命令書に対して、出願人は、規定期間内に、
- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☐ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、異議を申し立てた。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申し立てたが、規定の異議申立手数料を支払わなかった。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。
2. ☒ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。
3. 国際予備審査機関は、PCT規則 13.1、13.2 及び 13.3 に規定する発明の単一性を次のように判断する。
- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。
- 請求の範囲 1,5-11 に共通の事項は「メチルリジンを特異的に認識し、リジンを認識し得ない抗メチルリジン抗体」である。
- しかしながら「メチルリジンを特異的に認識し、リジンを認識し得ない抗メチルリジン抗体」が、国際調査報告で引用された文献 (PETHE,K. et al, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, (2002), Vol. 99, No.16, pp.10759-10764) に開示されているから、新規でないことが明らかとなった。
- さらに、上記抗メチルリジン抗体が「モノクローナル抗体」であることや、「抗メチルリジン抗体を用いるメチル化タンパク質の検出方法」も、文献に開示されている (特に、Fig.4,5 参照)。
- それ故、請求の範囲 1,5-11 に記載の発明は「抗メチルリジン抗体がポリクローナル抗体」の一般的発明概念、「(ある共通の性質を有した、)ハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体」の一般的発明概念、「タンパク質を化学的にメチル化して得られた抗原で動物を免疫し、得られた抗体を該抗原とは異なるタンパク質を化学的にメチル化したタンパク質を認識する抗体を分泌するハイブリドーマを選択する、モノクローナル抗体の製造方法」の一般的発明概念の 3 つに分類される。
- してみれば、請求の範囲には、抗メチルリジン抗体に係る 3 の一般的発明概念が記載されているが、それぞれの一般的発明概念の間には、新規な特別の技術的特徴が共有されていないため、この国際出願は発明の単一性の要件 (法施行規則第 13 条 (PCT規則 13.1、13.2 及び 13.3)) を満たしていないと認める。
4. したがって、国際出願の次の部分について、この報告を作成した。
- ☒ すべての部分
- ☐ 請求の範囲 _____ に関する部分

第Ⅴ欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第 12 条（PCT35 条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	7-10	有
	請求の範囲	1,5,6,11	無
進歩性 (I S)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1,5-11	無
産業上の利用可能性 (I A)	請求の範囲	1,5-11	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT 規則 70.7)

文献 1: WO 2002/18418 A1, (UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION), 2002.03.07

文献 2: PETHE, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2002), Vol.99, No.16, pp.10759-10764

技術情報 3: "Product Datasheet for ab7766", (2002), [online], ABCAM LIMITED

国際予備審査機関の見解書及び国際予備審査報告書において、初めて引用される文献

文献 4: STEINBRECHER, U. P. et al., J. Lipid Res., (1984), Vol.25, pp.1109-1116

(A)文献 1 には、メチルリシンを特異的に認識し、リシンを認識しない Methyl(K4)H3 及び Methyl(K9)H3 抗メチルリシン抗体が記載されており、当該 Methyl(K4)H3 等抗メチルリシン抗体がポリクローナル抗体であること、及び抗メチルリシン抗体を用いるメチル化タンパク質の検出方法も記載されている（特に、Fig.3 参照）。

(B)文献 2 には、メチルリシンを特異的に認識し、リシンを認識しない 4057D2 モノクローナル抗メチルリシン抗体が記載されており、当該抗メチルリシン抗体を用いるメチル化タンパク質の検出方法も記載されている（特に、Fig.4,5 参照）。

(C)技術情報 3 には、Histone H3(di methyl K4)antibody が記載されており、当該 Histone H3(di methyl K4)antibody が、ポリクローナル抗体であること、及び、ジメチル化したリシンを特異的に認識し、リシンを認識しないこと、さらに、Histone H3(di methyl K4)antibody を用いるメチル化タンパク質の検出方法が記載されている。加えて、Histone H3(di methyl K4)antibody が、2002 年に発表された文献(DOVER, J. et al., J.Biol.Chem., (2002), Vol.277, pp.28368-28371)において、既に使用されていたことも記載されている。

(D)文献 4 には、化学的にメチル化された、モルモット(guinea pig)の Low Density Lipoprotein(Met LDL)を、モルモットに免疫して調製した抗血清(ポリクローナル抗体)が記載されており(以下、文献 4 に記載の発明 1 という。)、当該ポリクローナル抗体と Met LDL の結合を検出する系を用いて、メチル化タンパク質を検出する方法も記載されている(特に、Fig.3 参照)。さらに、上記結合を検出する系に、メチル化したアルブミン、モノメチルリシン、ジメチルリシンの、それぞれを加えると、抗体と Met LDL の結合に対する競合阻害が生じ、リシンではこの競合阻害が生じないことから、上記ポリクローナル抗体はメチルリシンを認識し、リシンを認識しない抗体であると認める。加えて、上記結合を検出する系に、モノメチルリシンとジメチルリシンを同じ量添加した場合では、ジメチルリシンの方が、より強い競合阻害を生じさせることも記載されている。

(E)文献 4 には、化学的にメチル化された、モルモットのアルブミン(Me gp albumin)を、モルモットに免疫して調製した抗血清(ポリクローナル抗体)が記載されており(以下、文献 4 に記載の発明 2 という。)、当該ポリクローナル抗体と Me gp albumin の結合を検出する系を用いて、メチル化タンパク質を検出する方法も記載されている(特に、Fig.4 参照)。さらに、上記結合を検出する系に、メチル化したヒトアルブミン(Me h albumin)、ジメチルリシンの、それぞれを加えると、抗体と Me gp albumin の結合に対する競合阻害が生じ、リシンではこの競合阻害が生じないことから、上記ポリクローナル抗体はメチルリシンを認識し、リシンを認識しない抗体であると認める。加えて、モノメチルリシンとジメチルリシンを同じ量添加した場合では、ジメチルリシンの方が、より強い競合阻害を生じさせることも記載されている。

(1)請求の範囲 1,5,11 に記載の発明は、文献 1 により、新規性を有さない。

請求の範囲 1,5,11 に記載の発明と、文献 1 に記載の発明を対比すると、両者の発明は区別できない。

補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

第 I, V 欄の続き

[第 V 欄の続き]

(2)請求の範囲 1,6,11 に記載の発明は、文献 1 により、進歩性を有さない。

文献 1 には、Methyl(K4)H3 及び Methyl(K9)H3 抗メチルリジン抗体を調製する際に用いる抗原も記載されているところ、任意の抗原に対するモノクローナル抗体をマウス等の動物を用いて調製する方法は周知であるので、文献 1 に記載の抗原を用いて、Methyl(K4)H3 等の抗メチルリジン抗体と、同様の性質を有したモノクローナル抗体を調製することは、当業者には容易である。そして、そのことによる効果も、格別のものとは認められない。

(3)請求の範囲 1,6,11 に記載の発明は、文献 2 により、新規性を有さない。

請求の範囲 1,6,11 に記載の発明と、文献 2 に記載の発明を対比すると、両者の発明は区別できない。

(4)請求の範囲 1,5,11 に記載の発明は、技術情報 3 により、新規性を有さない。

請求の範囲 1,5,11 に記載の発明と技術情報 3 に記載の発明を対比すると、両者の発明は区別できない。

(5)請求の範囲 1,6,11 に記載の発明は、技術情報 3 により、進歩性を有さない。

技術情報 3 には、Histone H3(di methyl K4)antibody を調製する際に用いる抗原も記載されているので、技術情報 3 に記載の抗原を用いて、Histone H3(di methyl K4)antibody と同様の性質を有したモノクローナル抗体を調製することは、当業者には容易である。そして、そのことによる効果も、格別のものとは認められない。

(6)請求の範囲 1,5,11 に記載の発明は、文献 4 により、新規性を有さない。

請求の範囲 1,5,11 に記載の発明と、文献 4 に記載の発明を対比すると、前者のポリクローナル抗体と、後者の発明 1、発明 2 のポリクローナル抗体はそれぞれ区別できないので、両者の発明は区別できない。

(7)請求の範囲 1,6-8,11 に記載の発明は、文献 4 により、進歩性を有さない。

文献 4 に記載の Met LDL や Me gp albumin 等のメチル化したタンパク質を用いて、文献 4 に記載の発明 1 または発明 2 のポリクローナル抗体と、同様の性質を有したモノクローナル抗体を調製することは、当業者には容易である。そして、そのことによる効果も、格別のものとは認められない。

(8)請求の範囲 1,6-8,10,11 に記載の発明は、文献 4 により、進歩性を有さない。

文献 4 は、修飾されたリシン残基に特異的な抗体であって、免疫したタンパク質以外のタンパク質に含まれる、修飾されたリシン残基にも反応性を有する抗体の調製を課題としていると認めるところ(特に、Abstract 参照。)、ペプチド等の抗原を動物に免疫して調製した、いくつかのハイブリドーマの中から、抗原に対するモノクローナル抗体の反応性を指標に、所望の反応性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選別する、モノクローナル抗体の調製方法は周知の技術である。したがって、修飾されたリシン残基に特異的なモノクローナル抗体であって、免疫したタンパク質以外のタンパク質に含まれる、修飾されたリシン残基にも反応性を有する抗体を調製するため、文献 4 に記載の Met LDL や Me gp albumin 等メチル化したタンパク質を、動物に免疫して調製した、いくつかのハイブリドーマの中から、免疫したタンパク質以外のメチルリシンを含むタンパク質とも反応することを指標に、モノクローナル抗体を選別し調製することは、当業者には容易である。そして、そのことによる効果も、格別のものとは認められない。

(9)請求の範囲 1,5,9,11 に記載の発明は、文献 4 により、進歩性を有さない。

ポリクローナル抗体から、ペプチド等の抗原に対して所望の反応性を有する抗体画分を調製する方法であって、抗原を固定化したカラム等を用いて、抗体をアフィニティー精製する方法は、周知の技術である。したがって、修飾されたリシン残基に特異的なポリクローナル抗体であって、免疫したタンパク質以外のタンパク質に含まれる、修飾されたリシン残基にも反応性を有する抗体を調製するため、文献 4 に記載の発明 1 または発明 2 のポリクローナル抗体、または、文献 4 に基づいてメチル化したタンパク質を免疫して調製したポリクローナル抗体から、メチルリシンや免疫したタンパク質以外のメチル化したタンパク質とも反応することを指標にアフィニティー精製を行い、抗体画分を調製することは、当業者には容易である。そして、そのことによる効果も、格別のものとは認められない。

[第 I 欄 4. の続き]

「動物由来のヒストン及び Elongation factor 1 α に反応性を示す」という記載を追加する、請求の範囲 1 の補正、及び、「異種タンパク質」という記載を追加する、請求の範囲 9,10 の補正は、国際出願の出願時における明細書、請求の範囲、図面に記載した事項の範囲を超えてされたものと認める。

実施例 6,7 には、ヒト T 細胞白血病細胞株である MOLT-4F の、14.4k と 21.5k の間の分子量を有するタンパク質及び Elongation factor 1 に対して結合する抗体は記載されているが、当該抗体が、ヒトのヒストン及びヒト以外の動物のヒストンや、ヒト以外の動物の Elongation factor 1 α に反応性を示すことは、当業者にとって自明の事項とは認められない。また、明細書[0013]段落、及び、実施例には、メチル化した KLH 等のタンパク質をマウスやウサギに免疫することは記載されているが、免疫する種とは異なる種のタンパク質(異種タンパク質)を動物に免疫することは、当業者にとって自明の事項とは認められない。

請求の範囲

- [1] (補正後) 以下の5つ全ての性質を有する抗メチルリジン抗体。
- (1) ジメチルリジン及びモノメチルリジンと特異的に結合する。
 - (2) リジンには結合しない。
 - (3) ジメチルリジンに対する反応性がモノメチルリジンに対する反応性よりも強い。
 - (4) 周辺アミノ酸残基に影響されることなくタンパク質中のメチルリジン残基を特異的に認識し得る。
 - (5) 動物細胞由来のヒストン及び Elongation factor 1 α に反応性を示す。
- [2] (削除)
- [3] (削除)
- [4] (削除)
- [5] ポリクローナル抗体である請求項1に記載の抗体。
- [6] モノクローナル抗体である請求項1に記載の抗体。
- [7] (補正後) 抗メチルリジン抗体を産生するハイブリドーマであって、MEK3D7 (受託番号 FERM P-19595)、MEK4E10 (受託番号 FERM P-19596)、MEK5F7 (受託番号 FERM P-19597)、MEK2-5A11 (受託番号 FERM P-10593)、及び MEK2-5B11 (受託番号 FERM P-19594) からなる群より選択されるハイブリドーマ。
- [8] 請求項7に記載のハイブリドーマより産生される抗メチルリジンマウスモノクローナル抗体。
- [9] 請求項5に記載のポリクローナル抗体の製造方法であって、タンパク質を化学的にメチル化して得られた抗原で動物を免疫し、得られた抗体を該抗原とは異なるタンパク質を化学的にメチル化したタンパク質またはメチルリジンを用いたアフィニティー精製を行うことを特徴とする前記方法。
- [10] 請求項6に記載のモノクローナル抗体の製造方法であって、タンパク質を化学的にメチル化して得られた抗原で動物を免疫すること、および該抗原とは異なるタンパク質を化学的にメチル化したタンパク質を認識する抗体を分泌するハイブリドーマを選択することを特徴とする前記方法。
- [11] 請求項1乃至6または8に記載の抗体を用いる、メチル化タンパク質の検出方法。

請求の範囲

- [1] 以下の5つ全ての性質を有する抗メチルリジン抗体。
- (1) ジメチルリジン及びモノメチルリジンと特異的に結合する。
 - (2) リジンには結合しない。
 - (3) ジメチルリジンに対する反応性がモノメチルリジンに対する反応性よりも強い。
 - (4) 周辺アミノ酸残基に影響されことなくタンパク質中のメチルリジン残基を特異的に認識し得る。
 - (5) 動物細胞由来のヒストン及び Elongation factor 1 α に反応性を示す。
- [2]
- [3]
- [4]
- [5] ポリクローナル抗体である請求項1に記載の抗体。
- [6] モノクローナル抗体である請求項1に記載の抗体。
- [7] (補正後) 抗メチルリジン抗体を産生するハイブリドーマであって、
MEK3D7 (受託番号 FERM P-19595)、MEK4E10 (受託番号 FERM P-19596)、
MEK6F7 (受託番号 FERM P-19597)、MEK2-5A11 (受託番号 FERM P-19593)、
及び MEK2-5B11 (受託番号 FERM P-19594) からなる群より選択されるハイブリドーマ。
- [8] 請求項7に記載のハイブリドーマより産生される抗メチルリジンマウスモノクローナル抗体。
- [9] (補正後) 請求項5に記載のポリクローナル抗体の製造方法であって、異種タンパク質を化学的にメチル化して得られた抗原で動物を免疫し、得られた抗体を該抗原とは異なるタンパク質を化学的にメチル化したタンパク質を用いたアフィニティー精製を行うことを特徴とする前記方法。
- [10] (補正後) 請求項6に記載のモノクローナル抗体の製造方法であって、異種タンパク質を化学的にメチル化して得られた抗原で動物を免疫すること、および該抗原とは異なるタンパク質を化学的にメチル化したタンパク質を認識する抗体を分泌するハイブリドーマを選択することを特徴とする前記方法。
- [11] 請求項1乃至6または8に記載の抗体を用いる、メチル化タンパク質の検出方法。